

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

06-077694/12 804 D16 S03 TAKE 15.02.84
 TAKEDA CHEMICAL IND KK *J6 0169-495-A
 15.02.84-JP-027775 (02.09.85) C07h-21/04 C12n-15 G01n-33/53
 Novel poly:de:oxy:nucleotide for diagnosing hepatitis B etc. - obtd. by
 linking hapten to phosphoric acid portion opt. via ligand
 C86-033074

A novel polydeoxynucleotide (I) is obtd. by linking a hapten to the 5' terminal phosphoric acid portion directly or via a ligand.

USE

For detecting a specific base sequence in a polynucleotide (PN) by hybridizing (I) with PN in cells or fixed to a support introducing fluorescence or enzyme label to the resulting hybrid immunologically, and detecting the photoresponse generated by photoexcitation or substrate addition.

Genes of HBV, ATLAV or HLA can be detected, and the method is valuable in diagnosis of hepatitis B and adult leukaemia.

HAPTEN

Suitable haptens are 2,4-dinitrophenyl, biotinoyl, aldosterone, testosterone and diphenylhydantoin.

The hapten is pref. bonded to the 5' terminal phosphoric

B(4-B4A1, 12-K4A1, 12-K4A4) D(5-H6, 5-H9, 5-H12)

acid portion of a polydeoxynucleotide via a ligand, e.g. -A-Z(A = bond or -X-(CH₂)_n-; X = O, NH or bond; Z = O or NH); particularly suitable is -NH-(CH₂)_nNH-.

DETECTION PROCEDURE

PN to be detected is fixed to a support such as nitro-cellulose filter in conventional manner, and if desired denatured with alkali or by heating to form a single chain PN.

The filter contg. fixed PN is hybridized with (I) in a buffer, reacted with anti-hapten IgG or antiserum, then further reacted with enzyme- or fluorescence-labelled anti-IgG antibody.

Substrate is suitable hydrogen peroxide, and dye is e.g. ortho-dianisidine. (5ppW108DAHdWgNo0/0).

J60169495-A

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.

128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England

US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101

Unauthorised copying of this abstract not permitted.

⑬ 公開特許公報(A) 昭60-169495

⑭ Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑮ 公開 昭和60年(1985)9月2日
 C 07 H 21/04 7252-4C
 C 12 N 15/00 7115-4B
 G 01 N 33/53 7906-2G
 // A 61 K 39/295 7043-4C 審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑯ 発明の名称 変性されたDNAおよびその用途

⑰ 特 願 昭59-27775

⑱ 出 願 昭59(1984)2月15日

⑲ 発 明 者 福 田 常 彦 京都市西京区大原野西境谷町2-9番10-202号

⑳ 発 明 者 丸 本 龍 二 芦屋市奥池南町53番1号

㉑ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地

㉒ 代 理 人 弁理士 天 井 作 次

明 細 書

1. 発明の名称

変性されたDNAおよびその用途

2. 特許請求の範囲

- (1) 5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経
てヘアテンを結合せしめてなるポリデオキシヌク
レオチド。
 (2) 5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経
てヘアテンを結合せしめてなるポリデオキシヌク
レオチドを、細胞中あるいは支持体に固定された
試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、
該ハイブリッドに免疫学的手法で蛍光または酵素標
識を導入し、光検起または基質添加によつて生じ
る光応答を検知することを特徴とするポリヌクレ
オチド中の特定塩基配列の検出法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は変性された新規DNAおよびその用途
に関する。

生化学研究において放射性同位元素を用いる突
破は敏感な方法として広く利用されている。しか

し被検の危険性や廃棄物処理などに慎重な配慮が
要求され、これらの実験を行う上には莫大な費用
と特殊な空間を要する。さらに ^{32}P および ^{125}I
などの半減期は短かく、これらを含む試薬は
保存がきかないため用事調製といつた不便さがつ
きまとう。

一方、現在分子生物学において特定の遺伝子の
検出あるいは同定のために、それらと相補的な塩
基配列を持つデオキシヌクレオチド(以下DNA
と略記することがある)あるいはRNAフラグメ
ントによる核酸ハイブリッド形成法が採用されて
いる。現在この方法は主として ^{32}P を使用してい
るが、その短い寿命故に基礎研究のみに限定され、
病院などにおける臨床検査の一手段としては利用
されていない。

ウイルス遺伝子あるいは診断に値する異常染色
体など特定DNA配列を簡便かつ迅速に検出する
ことは臨床において特に重要であり、ある種のウ
イルス性疾患のように病原が検出されない場合で
も、生体組織中のウイルスゲノムを直接検出する

ことが望まれている。

最近、非放射性免疫分析法は充分放射性免疫分析法に匹敵することが示されているが、本発明者らは蛍光免疫アッセイや酵素免疫アッセイの手法を抗体ハイブリッド形成法と結合させることにより高感度の特定遺伝子分析法を開発できると考え、鋭意研究を行い本発明を完成した。

すなわち本発明は、5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経てハプテンを結合せしめてなるポリデオキシヌクレオチド、ならびに該ポリデオキシヌクレオチドを細胞中あるいは支持体に固定された試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ該ハイブリッドに免疫学的手法で蛍光または酵素標識を導入し、光増強または基質添加によつて生じる光応答を検知することを特徴とするポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法を提供するものである。

上記変性されたポリデオキシヌクレオチドに関し、ハプテンは低分子であつても抗原性を有するものであればいずれでもよいが、ハプテンに対す

る抗体の入手容易性から2, 4-ジニトロフェニルなどのジニトロベンゼン誘導体、ビオチノイル、イミノビオチノイルなどビオチン誘導体、アルドステロン、17- β -エストラジオール、テストステロンなどステロイド類、ジフェニルヒダントインなどヒダントイン誘導体が挙げられ、とりわけ2, 4-ジニトロフェニルが好ましい。

ハプテンは直接ポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していてもよいが、リガンドを経てポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していることが好ましい。該リガンドとしては、式-A-Z-（式中、Aは結合手または式-X-(CH₂)_n-（XはO、NHまたは結合手を、nは1~8の整数を示す）、ZはOまたはNHを示し、ハプテンはAに、ヌクレオチドの5'末端リン酸部はZに結合している）で表わされる基が挙げられる。なかでもリガンドとして式、-NH-(CH₂)_n-NH-（nは上記と同意義）であるものが好ましく、とりわけnが2であるものが好ましい。

上記ポリデオキシヌクレオチド（以下、ポリDNAと略称することがある）は、検出対象となる遺伝子、ウイルスなどのポリヌクレオチドの特定塩基配列に相補的なポリDNAである。該ポリDNAは塩基数として8以上、好ましくは12~1,000である。

上記ポリDNAに関し、ポリDNAの鎖長の短いものは公知の化学合成によつて大量に得ることも容易である。鎖長の短いものは、ハイブリッド形成能の点で劣るため、G含量の高いものが望ましい。一般にゲノムの特定箇所を特異的に検出する場合には比較的鎖長の短いものがふさわしく、鎖長の長いアローブはゲノムの広領域にわたつて検定・検出する場合には有用であるが、若干特異性を欠く傾向にある。

比較的長い鎖長のアローブは、クローニングされたDNAを二本鎖のまま制限酵素によつて切り出されるが、ここで得られる異つた鎖長フラグメントはゲル電気泳動などで分離して使用されてもよいが、混合物のままハプテン化しても有利に使

用できる。

本発明の変性されたDNAを、例えばB型肝炎ウイルスの存在を検出するために用いる場合、ポリDNAとして例えば、表面抗原蛋白遺伝子とコア蛋白遺伝子との間に存在する塩基配列に相補的なTCTTATGTAAGACCTであるか、B型肝炎ウイルスDNAを制限酵素Sma3Aで分解して得られる平均200塩基対のポリDNAであることが好ましい。

本発明の変性されたDNAは、完全なポリDNAに、所望によりリガンドを有するハプテン化試薬を反応させるかまたはハプテンを有するポリDNAの一部を残りのポリDNAまたはDNAと結合させることにより製造できる。

具体的には、例えば2, 4-ジニトロフェニルエチレンジアミンやビオチンなどハプテン化試薬とポリDNAとを結合して製造することができる。

ハプテン化試薬の有するアミノ基をポリDNAのリン酸残基と反応させる場合は、トリフェニルホスフィンと2, 2'-ジビリリジンジスルフィド

(I) $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{TCTTT}$ の合成:

5'保護基を除いたトリマー (CTT) 100 ㎎と 3'-末端の保護基を除いた $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{T} 50$ ㎎とを乾燥ピリジン 1 ㎖ 中メチレンスルホンニトロトリアゾール (MSNT) 70 ㎎の存在下 1 時間融合。反応液に少量の水を加え、濃縮乾固。残液をアセトンに溶解し、白濁するまで水を加えたのちクロロアセツ P-8 (メルク社) 30 ㎖のカラムに吸着させ、アセトン-酢酸トリエチルアミン (0.01 M) 3:2 v/v 混液 100 ㎖で洗い、次いで上記 7:3 v/v 混液 100 ㎖で溶出される分画を濃縮乾固。残留物を少量のクロロホルムに溶解し、これをシクロヘキサン中に滴下して得られる沈殿を遠心分離し、白色粉末 84 ㎎を得た。

(II) $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{TCTTATGT}$ の合成:

(II)の方法で得られたテトラマー 40 ㎎と常法によつて合成された A T O T 40 ㎎とを常法通り MSNT 100 ㎎で融合させ、(I)の方法と同様にして粉末状の目的物 60 ㎎を得た。

(III) $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{TCTTATGTAAGACCTOBz}$

の合成 (完全保護ペンタデカマー):

(III)の方法で得たオクタマー 40 ㎎と 3'-末端の水酸基がベンゾイル基で保護されたペンタデカマー AA GACCTOBz 40 ㎎とを MSNT 100 ㎎を用いて融合し、常法に従つて目的物 60 ㎎を単離した。

(IV) 完全保護ペンタデカマーの保護基除去:

完全保護ペンタデカマー 60 ㎎を酢酸-トリエチルアミン混液 (2:1 v/v) 15 ㎖に溶解。重碳酸イソアミル 0.5 ㎖を加え 35℃で 7 時間攪拌。反応液を濃縮乾固したのち、ピリジンを加えて再度濃縮し、重碳酸イソアミルを完全に除去。残液に濃アンモニア水 5 ㎖を加え 25℃で 20 時間密栓放置したのち、60℃で 4 時間加熱。アンモニア水を留去し、残液を 0.01 M 重碳酸トリエチルアミンに溶かし、エーテルで 2 回洗浄。次にセファデックス G-50 で最初に溶出される分画を分取し、続いてイオン交換高速液体クロマトグラフィー (パーテシル SA X-10, φ 0.4 × 30 cm, NaH_2PO_4 緩衝液 (pH 6.3) による直

線勾配溶出法, 0.15 M (15% エタノール含有) から 0.3 M (30% エタノール含有) まで 10 分間で変化) において最も速く溶出される主分画を分取し、SEP-PAGE (ウォーターズ) で脱塩し、逆相高速液体クロマトグラフィー (ヌトレオシル-C₁₈) で単一のピークを示すもの 35 0.0 ㎖を得た。本品は細菌のアルカリホスファターゼで 5'位を脱リン酸したのち、³²P で 7'位を標識した A T P とポリヌクレオチドキナーゼで 5'位を放射標識し、マキサム-ギルバート法によつて目的とする塩基配列に一致することを確認した。

実施例 3

実施例 2 例で得たペンタデカマー 850 ㎖を水 30 ㎖に溶解。ここに 2, 4-ジニトロフェニルエチレンジアミン 13 ㎎の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 300 ㎖を加え、氷 0℃でトリフェニルホスフィン 39 ㎎と 2, 2'-ジビリジリルジスルフィド 33 ㎎を加えた。その後同温度で 1 時間毎にトリフェニルホスフィンと 2, 2'-ジビリジリルジスルフィドを一回目と同量、さらに

2 度にわたつて加え、反応液に水 2 ㎖を加え、酢酸エタニル 2 ㎖で 2 度洗浄した。水層を濃縮乾固し、残液を少量の 0.01 M 重碳酸トリエチルアミンに溶かし、セファデックス G-50、次いで高速液体クロマトグラフィー (パーテシル SA X-10) によつて精製し、200 ㎖の黄色粉末として、2, 4-ジニトロフェニル-NHCH₂CH₂NH-PO₂-TCTTATGTAAGACCT (DNA プローブ) を得た。

実施例 4

B型肝炎ウイルス Adw の全遺伝子を含む pBR 322 由来のプラスミド pBR322-EcoRI/HBv 933 (特開第 58-194897 号公報参照) 1 ㎖を EcoRI で切断し、アガロース電気泳動に付し、臭化エチジウムで蛍光染色すると二本のバンドが検出された。分子量の大きいバンド (ウイルスゲノムを含む) をニトロセルロースに転位させ、セルロース上に固定された DNA を 80℃で 3 時間加熱変性させ、フィルターを実施例 3 で得られた DNA プローブ 2 ㎖と緩衝液 200 ㎖

など脱水処理の存在下反応させることができ、通常 N、N'-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、水やこれらの混合物など極性溶媒中を行う。反応温度は -10 ~ 10℃ である。

ハプタン化試薬の有するカルボキシル基を反応させる場合は、成ハロゲン化物として用いることが好ましい。

かくして得られる本発明の変性された DNA は、抽出、カラムクロマトグラフィー、再結晶、再沈降など通常の化学的操作用により分離、精製することができる。

本発明の変性された DNA は低毒性であり、安全に、例えば以下の用途に用いることができる。

本発明の変性された DNA を用いるポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出は、例えば以下の方法によつて行うことができる。

検出しようとするポリヌクレオチドを常法によりニトロセルロースフィルム等の支持体に固定し、所望によりアルカリ、加熱等により変性させ、一本鎖ポリヌクレオチドとする。

ヌクレオチド中の特定塩基配列の有無を知ることができる。基質としては過酸化水素など、発色剤としてはオルトジアニソリンなどを例示することができる。

本発明の変性された DNA を用いるポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法により、B型肝炎ウイルス (HBV)、成人白血病ウイルス (ATLA)、人白血球抗原 (HLA) 等の遺伝子を検出することができ、B型肝炎や成人白血病の診断や HLA 型判定のために有用である。

具体的には、診断の対象となる動物 (マウス、イヌ、ヒトなど) の血清等を用い本発明の如く実施例 6 記載の方法や公知 (例えば、プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA 第 79 巻、7522-7526 頁、1982 年) の方法に準じて行うことができる。

本発明細書中記号の意義は以下のとおりである。

A: デオキシアデニン塩基 C: デオキシシトシン塩基
T: テミジン塩基 Ph: フェニル
G: デオキシグアニン塩基 Bz: ベンゾイル

以下実施例によつて本発明を具体的に説明する

上記ヌクレオチドを固定したフィルムとハプタン化された DNA (DNA プローブ) を緩衝液中でハイブリダイズさせる。

上記処理したフィルムを、トリス-塩酸、ヒトアルブミン等を含有する食塩水で洗浄し、ウサギ抗ジニトロフェニル-β-血清アルブミン (ウサギ抗 DNP-BSA) など抗ハプタン IgG あるいは抗血清と反応させる。抗ハプタン IgG 等は、ヒトアルブミンやヤギ血清を含む希釈食塩水として用いることが好ましい。

食塩水等で洗浄後、該反応させたフィルムを西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体など各種ペルオキシダーゼヤルニフェラーゼで酵素標識した抗 IgG 抗体やエタノール、アミノヘキサンアデノシンヌクレオチドなどで蛍光標識した抗 IgG 抗体と反応させる。該反応はヒトアルブミンやヤギ血清等の共存する食塩中で行うことが好ましい。

上記反応したフィルムを光増感または基質添加して、生ずる光応答を検知することによりポリ

が、本発明はこれらに制限されるものではない。

実施例中、保護されたヌクレオチドの保護基は、5'位についてはジメトキシトリチルであり、リン酸については p-クロロフェニルと β-シアノエチルである。

実施例 1 (PhNH)₂P-OT の合成:

5'位を脱保護した保護 T 460mg と 1-メチルイミダゾール 120mg をピリジン 10ml に溶解し、ジフェニルアミノトリクロリド 400mg を加えた。6 時間後と 20 時間後に上記トリクロリド 400mg と 1-メチルイミダゾール 120mg を追加し、4 時間後に 1M 酢酸カリウム 5ml を加えて 10 分間攪拌。反応液にクロロホルム 20ml を加えて抽出し、クロロホルム層を 0.5M 酢酸二水素カリウム、次いで水で洗い、濃縮乾燥。残留物をシリカゲル 30g を用い、CHCl₃-MeOH (9:1) で精製し、目的物 370mg を得た。R_F = 0.11 (キーゼルゲル 60F-254, メルク社、クロロホルム-メタノール 19:1 V/V)

実施例 2

中でハイブリダイズさせた。セルロースを3%のヒト・アルブミンを含む食塩水(9% NaCl の10 mM トリス・塩酸緩衝液, pH 7.4)に浸し、食塩水で洗い、ウサギ抗DHP-BSA血清(10倍希釈)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水希釈液に2時間浸した。食塩水で5回洗い、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG抗体(200倍希釈)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水に2時間浸した。再び食塩水で5回洗い、0.0025%オルトジアニジン、0.01%過酸化水素(10 mM トリス・塩酸緩衝液, pH 7.4)に30分間浸し、水洗、乾燥すると、ウイルスゲノムを含むバンドのみ赤褐色を呈し、pBR322 由来のバンドは全く着色しなかった。

実施例5

プラスミドpBR322 にB型肝炎ウイルスDNAを出し込みクローニングして得られるプラスミドpBR322-EcoRI/HBV933 (前出) 23μgを制限酵素EcoRIで消化し、アガロースゲル電

気泳動で分離精製し、肝炎ウイルスDNA(470μg)を得た。この内390μgを制限酵素Sma3Aで分解後、精製して平均200塩基対のDNAフラグメントを含む混合物(220μg)を得た。このDNAのうち50μgを2,4-ジニトロフェニルエチレンジアミン(135μg)と共にN,N-ジメチルホルムアミド(300μg)-水(30μg)の混合液に溶かし、氷冷下にトリフェニルホスフィン(39μg)と2,2'-ジビリミジルジルスルフィド(33μg)を加えた。後二者の試薬を1時間毎にさらに2回加え、最後に加えてから1時間後に水(1ml)と酢酸エチル(4ml)を加えて抽出した。水層を蒸発し、この母液をセファデックスO-25のカラム(0.6×25cm)の上端に注いだ。カラムを0.15モルの食塩を含むトリス・塩酸緩衝液(20ミリモル濃度, pH 8.0)で展開し、最も早く溶出するピークを採めた。エタノール沈殿により、2,4-ジニトロフェニルで修飾されたDNA混合物(40μg)を得た。ニトロセルロースフィルターにプラスミド

pBR322-EcoRI/HBV933 の塩々の濃度の希釈水溶液をスポットし、80℃、3時間加熱乾燥し、次いでこのフィルターを常法通りハイブリダイゼーションの前処理に付した。前述のジニトロフェニルエチレンジアミンでハプテン化したDNA(1μg)をプローブとし、400μgの溶液中、40度 16時間、フィルター上に固定したDNAとハイブリダイゼーションさせた。以後、実施例4と同様の酵素免疫法の諸過程を施した。その結果フィルター上の1ナノグラムのpBR322-EcoRI/HBV933 のスポットにまで明らかな発色が認められた。

実施例6

B型肝炎表面抗原キャリアーの血清(300μg)を2%のドデシル硫酸ナトリウム、サケ精液DNA(40μg/ml)およびプロタイナーゼR(2μg/ml)を含む150 mM 食塩/10 mM EDTA/10 mM トリス塩酸(250μg)中に加え、37℃で4時間インキュベートしたのち、等容の上記緩衝液を飽和したフェノール、次いでクロロ

ホルム/イソアミルアルコール(24:1)で洗う。1/10容の3M酢酸ナトリウムと2倍容のエタノールを用いてDNAを沈めて乾燥する。これを0.3M水酸化ナトリウム(10μg)で室温下10分間変性させ、2M酢酸アンモニウム(10μg)で中和し、ニトロセルロース・フィルター上にスポットする。常法通りのハイブリダイゼーションの前処理に付した後、ハプテン化DNA(1μg, 400μg)を用いて実施例5と同様に処理するとスポットは特有の赤褐色を呈する。

代理人 井理士 天井 作次

